

# Mycophenolic Acid와 Rapamycin이 저산소 하의 사람 신세뇨관 상피세포에서 Toll Like Receptor 아형의 표현에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 장기이식연구소<sup>1</sup> 및 외과학교실<sup>2</sup>, 병리학교실<sup>3</sup>

이다혜<sup>1</sup> · 박제현<sup>1</sup> · 김유선<sup>1,2</sup> · 정현주<sup>3</sup>

## Effects of Mycophenolic Acid and Rapamycin on Toll-like Receptor Expression in Hypoxic Human Proximal Tubular Epithelial Cells

Dahye Lee, M.S.<sup>1</sup>, Jehyun Park, Ph.D.<sup>1</sup>, Yu Seun Kim, M.D.<sup>1,2</sup> and HyeonJoo Jeong, M.D.<sup>3</sup>

The Research Institute for Transplantation<sup>1</sup>, Departments of Surgery<sup>2</sup> and Pathology<sup>3</sup>,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Toll like receptor (TLR), an element of innate immunity, is upregulated by Ischemia/reperfusion (IR) injury and may be involved in adaptive immune response. Immunosuppressive agents may increase or attenuate IR injury and TLR expression. To explore the involvement of TLRs in hypoxic tubular injury and modification by mycophenolic acid (MPA) rapamycin (RAP), this study examined TLR expression in hypoxia-induced human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2).

**Methods:** HK-2 cells were cultured in keratinocyte-SFM media supplemented with epidermal growth factor and bovine pituitary extract. The induction of hypoxia was achieved using GasPak pouch system. TLR 2, 3, and 4 mRNA expression was analyzed by real time RT-PCR using SYBR green and TLR 4 protein expression was evaluated by Western blot analysis. MPA at concentration of 100 nM and 1uM and RAP at concentration of 20, 50, and 100 nM were added to culture medium.

**Results:** TLR4 but noTLR2 or TLR3 mRNA expressions increased in hypoxic HK-2 cells at 24 and 48 hrs. TLR4 protein expression also increased in hypoxic HK-2 cells at 24 and 48 hrs. MPA (100 nM and 1uM) and RAP (20, 50, and 100 nM) decreased hypoxia-induced TLR4 mRNA expression in HK-2 cells compared to normoxia at 24 hrs. However, TLR4 protein expression was decreased only by RAP at 20 and 50 nM.

**Conclusions:** The results suggest that RAP may modify hypoxic renal tubular damage by decreasing TLR4-mediated inflammatory and immune reactions.

**Key Words:** Human renal proximal tubular epithelial cells, Mycophenolic acid, Rapamycin, Toll like receptor

**중심 단어:** 신세뇨관 상피 세포, 마이코페놀산, 라파마이신, Toll like receptor

## 서 론

허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)은 신장이 식 시 겪게 되는 피할 수 없는 과정으로 이식 후 야기되는 급성 또는 만성적인 이식신 기능부전을 초래하는 중요한 원인 중 하나로 알려져 있으며 그 병태생리에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 최근 이런 비 면역학적 손상

이 내재 면역 반응(innate immune response)을 야기 시키고 나아가 적응 면역(adaptive immunity)으로 진행하게 된다는 연구들이 보고되어 이식신 기능부전과의 연관성을 설명하고 있다.(1)

Toll like receptor (TLR)는 초파리(*Drosophila*)의 발생단계와 면역반응에서 중요한 역할을 하는 'Toll'에서 유래하며 외부의 침입으로부터 숙주를 보호하는 기본적인 방어 기전을 담당한다. 또한 뇌, 간 등의 세포나 조직에서 허혈로 인한 손상으로 인해 생산되는 내인성 리간드들을 인식하여 내재면역을 활성화한다는 것이 알려지고 있다.(2)

신장질환에서 허혈과 관련된 TLR의 변화는 동물실험에서 근위세뇨관 세포를 대상으로 연구가 진행되었다.

책임저자 : 정현주, 서울시 서대문구 신촌동 134번지  
연세대학교 의과대학 병리학교실, 120-752  
Tel: 02-2228-1766, Fax: 02-2227-7891  
E-mail: jeong10@yuhs.ac

접수일 : 2008년 12월 2일, 게재승인일 : 2009년 6월 1일

허혈 손상을 유발한 흰쥐의 신세뇨관 세포에서 TLR4의 mRNA와 단백질 발현이 증가하였으며(3) TLR4/MyD88 경로가 활성화됨이 보고된 바 있다.(1) 또한 TLR2 유전자가 결손된 흰쥐의 허혈 손상 시 여러 싸이토카인과 chemokine들의 발현이 감소되었다고 보고되어,(4) TLR이 허혈과 그로 인해 활성화되는 염증반응을 통해 세뇨관 손상에 중요한 역할을 하고 있음을 암시하고 있다. 이식과정에서 발생하는 허혈에 의한 손상 외에도 면역억제제에 의해 허혈 손상은 가중될 수 있다. Cyclosporin (CsA)은 1970년대 Clalne 등이 임상에서 사용하면서 그 월등한 효과로 인해 각광을 받아왔지만 약제 자체의 신독성 뿐 아니라 허혈 손상을 가중시키는 작용이 있어 장기간 투여 시 이식신의 기능 저하와 비가역적인 형태변화를 초래하여 사용에 한계가 있다.(5,6) CsA 외에도 이식환자의 면역억제제로 많이 쓰이는 Mycophenolate mofetil (MMF)와 rapamycin (RAP)은 다양한 임상연구에서 만성 거부반응에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. MMF는 inosine monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2) 차단제로 림프구 증식을 억제시킨다. RAP는 mTOR inhibitor로 역시 림프구 증식을 억제시킨다. 그러나 신허혈 손상에 대한 이 두 약제의 효과는 보고에 따라 달라 신손상의 경감 또는 지연 등이 보고되었다. 또한 TLR 표현과 관련하여 CsA는 생쥐모델에서 TLR4의 표현을 증가시킨다는 보고가 있으나(7) 신허혈에 대한 MMF 나 RAP의 영향이나 신장 내 TLR아형의 표현 양상변화에 대해서는 체계적인 연구가 필요한 실정이다.

본 연구는 사람의 신세뇨관 상피세포주를 이용하여 저산소가 TLR 아형의 표현변화에 미치는 영향을 관찰하고, 면역억제제인 MPA와 RAP가 저산소에 의한 TLR아형의 표현변화에 미치는 영향을 관찰함으로써 TLR과 관련되어 이 약제들에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1) 세포배양

사람 신세뇨관 상피세포(HK-2)는 ATCC에서 구입하여 사용하였다. 세포는 5 ng/ml recombinant epidermal growth factor와 0.05 mg/ml bovine pituitary extract가 함유된 keratinocyte-SFM 배지를 사용하여 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 세포가 배양용기를 채웠을 때 MPA와 RAP를 농도별로 처리하여 24시간 동안 반응 후 실험에 사용하였다. 저산소 상태는 저산소 상태를 유지하는 주머니(Gaspak pouch system, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 사용하였다.

**Table 1.** Primers used for real-time RT-PCR

ID	Forward	Reverse
TLR2	GCCAAAGTCTTGATTGATTGG	TTGAAGTCTCCAGCTCCTG
TLR3	GATCTGTCTCATAATGGCTTG	GACAGATTCGGAATGCTTGTG
TLR4	TGTATTCAAGGTCTGGCTGGTT	GCCCTCTAGAGCAGATTGTCA
GAPDH	GTCATCATATTTGGCAGGTT	GAAGGACTCATGACCACAGT

### 2) Real-time RT-PCR

총 RNA는 TRIzol (Invitrogen)로 분리하였고, 정량한 5 µg의 RNA는 reverse transcription premix (Maxime RT premix, 인트론, 서울, 한국)으로 42°C에서 50분간 반응시킨 후 95°C에서 10분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. TLR mRNA 수준은 SYBR green이 포함된 PCR master mix (ABI)를 사용하였고 sense와 antisense primer (Table 1)를 각각 10 pmol 가하여 95°C에서 4분간 초기 변성을 시킨 후 59°C에서 1분간 30 cycle을 시행하고, 60°C에서 1분간 그리고 72°C에서 10분간 마지막 반응을 시켰다. 분석은 7,500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)을 이용하였다. PCR 산물의 특이성을 확인하기 위하여 melting curve와 agarose gel 전기영동을 시행하였다.

### 3) 단백질 분리

시료채취를 위한 6 well plate의 well당  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 분주하여 자극을 주었으며, 실험이 종료된 후 세포는 PBS로 2회 세척한 후 세포 용해 완충액(20 mM Tris, pH 7.0, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 20 µM leupeptin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 1 mM EGTA, pH 8.0, 1 mM pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate)을 사용하여 얼음 위에서 60분간 반응시킨 후 13,000 rpm으로 15분간 4°C에서 원심 분리한 후 세포 내 단백질을 추출한다. 실험이 종료된 후 Bio-Rad 단백질 분석 kit을 사용하여 세포 용해액 내 단백질을 정량하였다.

### 4) Western blot analysis

세포 내 단백질을 함유한 세포질 용해액을 sample buffer (12 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% glycerol, 0.4% SDS, 2.88 mM 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue)와 혼합하여 95°C에서 5분간 가열하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전개 분리한 후 nitrocellulose 흡착지에 전이시킨 후 단백질에 대한 molecular marker를 사용하여 전개와 전이 정도를 확인하였다. 흡착지

를 5% non fat dry milk blocking 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응 후 0.1% Tween 20을 포함한 Tris 완충액으로 2회 세척한 후 일차항체로 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. 이후 이차 항체 (HRP-conjugated anti-rabbit IgG; Santa Cruz)로 1시간 동안 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하고 Enhanced Chemiluminescence (ECL: Amersham, Buckinghamshire, UK) kit을 이용하여 이차 항체를 검출하였다. 각각의 밀도를 Tina 2.1 프로그램을 사용하여 측정 후 정량 하여 대조군을 1.0으로 하여 비교하였다.

## 5) 통계처리

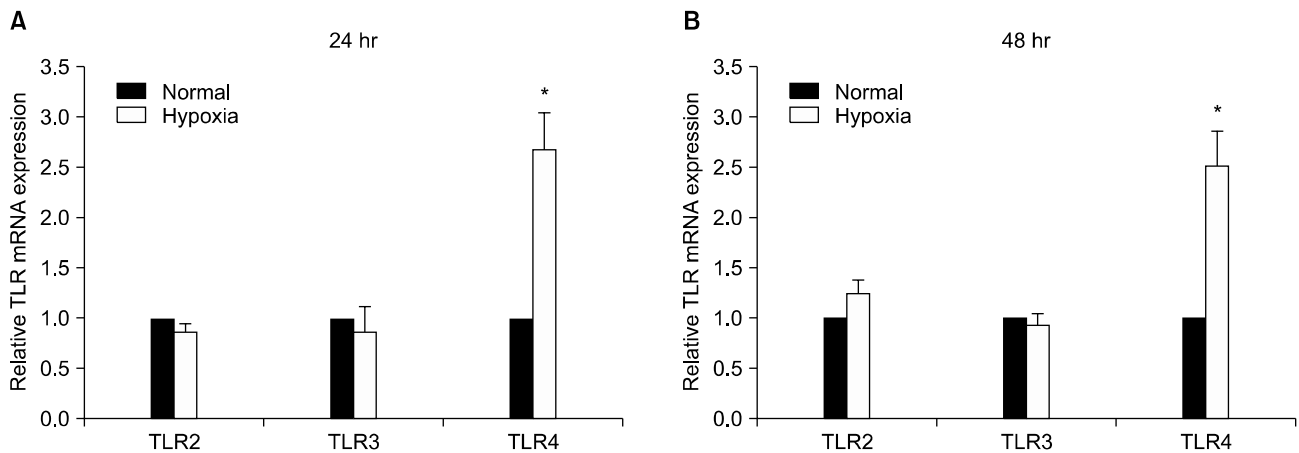
모든 실험결과와 측정치는 평균(mean)±표준 오차(standard error)로 나타내며 각 군간의 통계학적인 비교는 분산분석(ANOVA)과 Fisher's least significance differ-

ence test를 시행하여  $P$ 값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

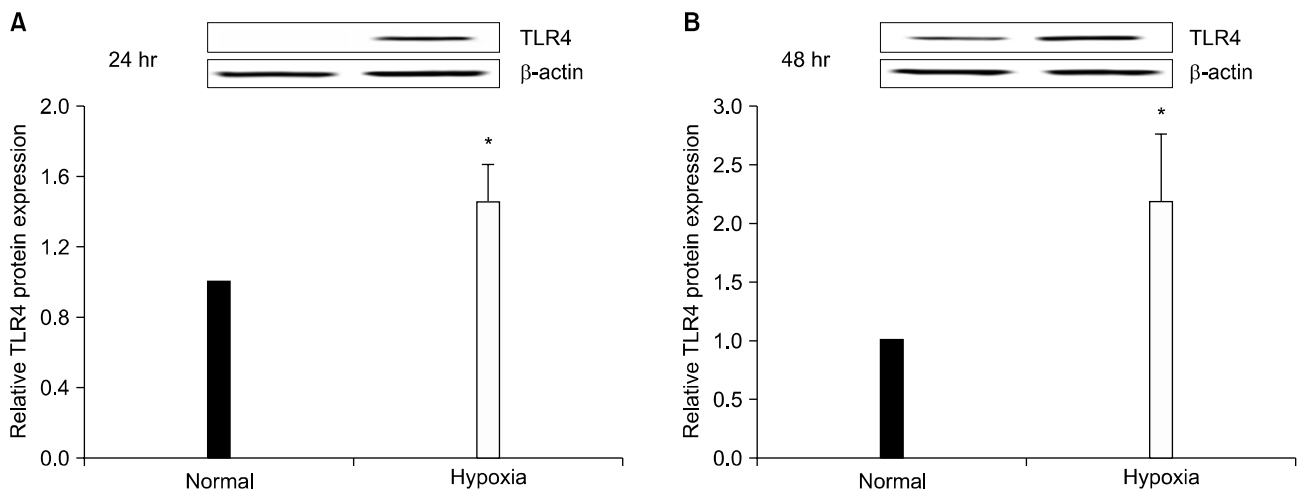
## 결 과

### 1) 저산소 하의 사구체 신세뇨관 상피세포주에서 TLR2, TLR3, TLR4의 mRNA 표현

저산소 자극 24시간과 48시간 후 각각 TLR2,3의 mRNA는 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성 있는 결과를 관찰할 수 없었다. 반면 TLR4의 mRNA는 대조군과 비교하여 2.7배 증가하였고(Fig. 1A) ( $P<0.05$ ), 48시간 후 2.5배 증가하였다(Fig. 1B) ( $P<0.05$ ).



**Fig. 1.** TLR2, 3 and 4 mRNA expressions in normal and hypoxic conditions of HK-2 cells, for (A) 24 hr and (B) 48 hr. Data are presented as the mean±SE of three experiments. \* $P<0.05$  vs. Normal TLR4.



**Fig. 2.** TLR4 protein expressions in normal and hypoxic conditions of HK-2 cells, for (A) 24 hr and (B) 48 hr. Data are presented as a representative Western blot of five experiments. \* $P<0.05$  vs. Normal.

## 2) 저산소 하의 사구체 신세뇨관 상피세포주에서 TLR4의 단백질변화

저산소 자극 24시간 후 TLR4 단백질은 대조군과 비교하여 1.5배 증가하였으며(Fig. 2A) ( $P<0.05$ ) 48시간 후에는 2.2배 증가하였다(Fig. 2B) ( $P<0.05$ ).

## 3) MPA가 저산소 하의 세포 내 TLR4 mRNA 발현에 미치는 영향

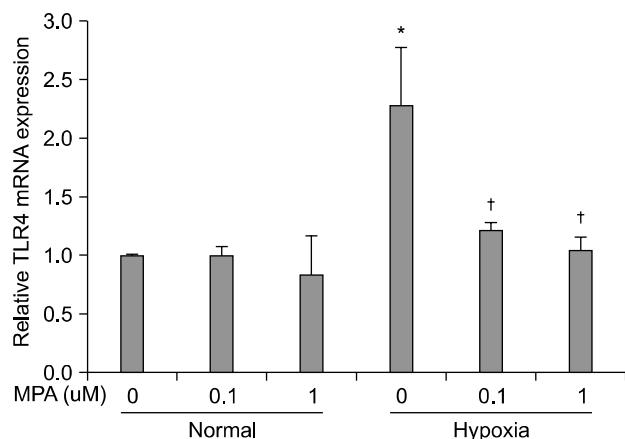
정상 대조군에서 MPA는 TLR4 mRNA 발현에 영향을 끼치지 않았으나, 저산소 하에서 2.7배 증가되었던 TLR4의 mRNA는 MPA를 0.1  $\mu$ M 처리 시 47% 감소하였고 1  $\mu$ M 처리 시 54%의 감소를 보여 통계적으로 유의하였다(Fig. 3) ( $P<0.0005$ ).

## 4) RAP가 저산소 하의 세포 내 TLR4 mRNA 발현에 미치는 영향

정상 대조군과 비교해 RAP는 TLR4 mRNA 발현에 영향을 끼치지 않았으나, 저산소 하에서 2.7배 증가되었던 TLR4 mRNA는 RAP를 20, 50, 100 nM 처리 시 각각 51%, 58%, 65%의 농도의존적인 감소 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 4) ( $P<0.005$ ).

## 5) MPA가 저산소 하의 세포 내 TLR4 단백질 발현에 미치는 영향

정상 대조군과 비교해 MPA는 TLR4의 단백질 발현에 유의 있는 변화를 관찰 할 수 없었다. 저산소 하에서 증가된 TLR4의 단백질 역시 MPA를 처리 시에도 유의있는 변화를 관찰 할 수 없었다(Fig. 5).



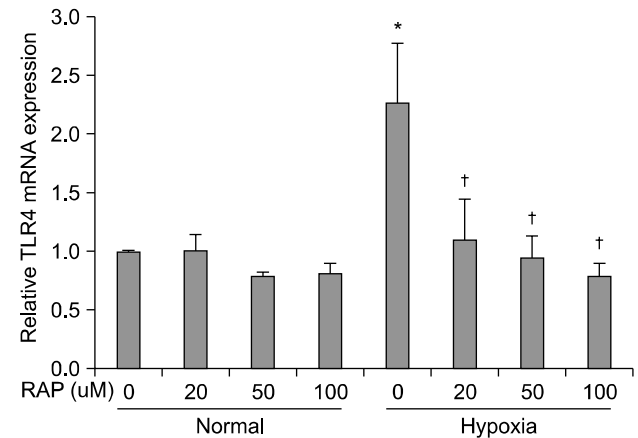
**Fig. 3.** Effect of MPA on TLR4 mRNA expressions in normal and hypoxic conditions of HK-2 cells. Data are presented as the mean $\pm$ SE of four experiments. \* $P<0.0001$  vs. Normal MPA 0  $\mu$ M. † $P<0.005$  vs. Hypoxia MPA 0  $\mu$ M.

## 6) RAP가 저산소 하의 세포 내 TLR4 단백질 발현에 미치는 영향

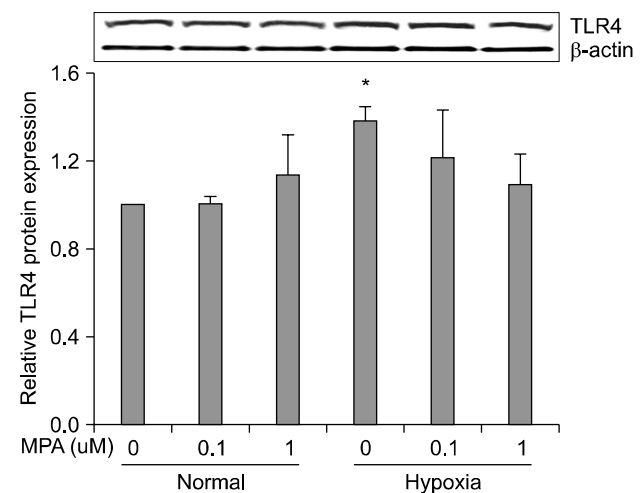
정상 대조군에서 RAP는 TLR4의 단백질 발현에 유의있는 영향을 끼치지 않았으나, 저산소 하에서 증가된 TLR4의 단백을 RAP 20, 50 nM 처리 시 각각 63%, 78%의 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 6) ( $P<0.05$ ).

## 고 찰

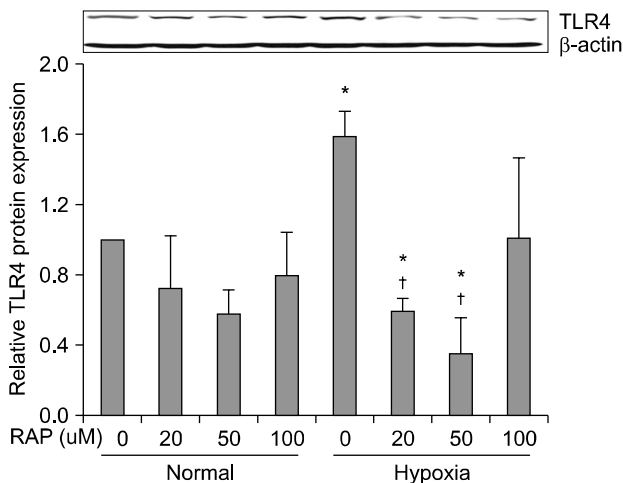
이식신의 허혈-재관류 손상이 이식 초기에 세뇨관 상피 변성 및 괴사를 초래하며 신기능을 저하시킨다는 사



**Fig. 4.** Effect of rapamycin on mRNA protein expressions in normal and hypoxic conditions of HK-2 cells. Data are presented as the mean $\pm$ SE of four experiments. \* $P<0.0001$  vs. Normal rapamycin 0  $\mu$ M. † $P<0.005$  vs. Hypoxia rapamycin 0  $\mu$ M.



**Fig. 5.** Effect of MPA on TLR4 protein expressions in normal and hypoxic conditions of HK-2 cells. Data are presented as the mean $\pm$ SE of three experiments. \* $P<0.05$  vs. Normal MPA 0  $\mu$ M.



**Fig. 6.** Effect of rapamycin on TLR4 protein expressions in normal and hypoxic conditions of HK-2 cells. Data are presented as the mean  $\pm$  SE of four experiments. \* $P$ <0.05 vs. Normal rapamycin 0 uM. † $P$ <0.05 vs. Hypoxia rapamycin 0 uM.

실은 널리 알려져 있다. 허혈-재관류 손상은 이식신의 비면역학적 손상을 일으킬 뿐만 아니라 유리된 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)에 의해 손상된 세포에서 내재면역의 구성성분인 TLR의 리간드가 발현되고, 이후 수지상 세포의 성숙과 활성화 과정을 통하여 적응면역반응으로 진행할 수 있기 때문에 면역학적 손상에도 관여할 수 있다.(2)

신장의 허혈-재관류 손상에서 내재면역과 관련하여 TLR4 및 TLR2를 중심으로 한 동물실험 결과가 보고되었다. Wu 등은 생쥐의 허혈 모델에서 신세뇨관 상피세포 내 TLR4의 발현 증가와 신간질 내 백혈구 침윤을 관찰하였으며, TLR4가 결손된 생쥐에서 허혈에 의한 세뇨관의 손상, 소변 내 크레아틴 농도, 대식세포의 침윤과 염증성 사이토카인의 발현 등이 감소됨을 보고하였다.(1) Lim 등은 쥐 신장의 허혈-재관류 손상 시 TLR2와 4의 mRNA 발현이 주로 신세뇨관 세포에서 증가하고 TLR 리간드인 heat shock protein 70이 증가하며 수지상 세포의 증가와 성숙을 통해 염증반응이 유발될 것이라고 보고하였다.(7) TLR2 유전자가 결손된 생쥐를 사용한 실험에서도 허혈 손상으로 인한 신장의 손상이 감소되고 MCP-1, IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인의 발현이 감소됨을 보고하였다.(4) 본 연구에서도 사람의 신세뇨관 상피세포주인 HK-2세포를 대상으로 TLR의 아형변화를 검색하였으며, TLR4의 mRNA와 단백질 저산소 상태에서 증가되었으나 TLR2나 TLR3의 변화는 관찰되지 않았다. TLR4는 여러 실험에서 보고된 바와 같이 허혈 손상 시 활성화되는 특이적 또는 비특이적 면역반응에 관여할 것

으로 추정할 수 있다. 또한 TLR3는 허혈과 관련이 없는 것으로 생각되었으나 TLR2의 결과는 기존의 보고와 달라 해석하기 어려웠다. 그러나 수차례 다양한 회사의 제품을 구입하여 검사하였어도 의미있는 TLR2의 변화가 없는 점을 고려하면, TLR4와 달리 TLR2의 발현은 세뇨관 세포 자체보다 다른 인자가 더 중요하게 작용할 가능성도 있다. 즉 신허혈과 관련하여 기존에 보고된 실험들은 생체 실험으로, 허혈 손상 시 세뇨관의 손상과 함께 간질 내 염증반응이 동반되어 있으며, 허혈이 감소됨에 따라 염증도 감소하므로, 허혈 시 TLR2의 변화는 세뇨관세포에 대한 직접적인 작용보다 신장 내 침윤된 염증세포와 이들이 분비하는 인자들의 효과일 가능성도 있다.

신이식과 관련하여 Braudeau 등은 신장이식 환자의 혈액 내 단핵세포에서 TLR4 표현이 증가된다고 보고하였다.(8) Ducloux 등은 TLR4 유전자의 다형성과 급/만성 거부반응이 관련된다고 보고하여(9,10) TLR4가 이식신의 적응면역반응에도 관련될 수 있음을 추정할 수 있었다. 최근 Kruger 등은 이식 시 공여자 신장에서 TLR4의 표현이 관찰되었고, TLR의 표현은 이식신이 사체에서 획득되었을 때 생체에서 획득된 경우보다 현저히 증가하였으며, 공여자가 사체인 경우에서만 이식신 세뇨관에서 TLR4의 내재성 리간드인 high-mobility group box-1 (HMGB1)의 표현이 증가하였다고 보고하여 허혈과 TLR4의 발현간의 상관성을 증명하였다. 또한 사람의 세뇨관을 HMGB1으로 자극하면 TLR4에 의존적으로 염증반응을 자극한다고 하여 TLR4 자체가 이식신내 염증에 기여한다고 보고하였다.(11)

이식 후 주 면역억제제로 흔히 사용되는 CsA은 신독성으로 인해 장기간 사용이 제한된다는 점 외에도 흰쥐 모델에서 TLR4의 표현 및 내재면역의 지표를 증가시킨다고 보고되어(7) 면역활성화에 따른 부작용도 존재한다. MMF와 RAP는 서로 작용기전은 다르나 림프구 증식을 억제시키며, CsA와 함께 사용하거나 또는 CsA를 대체하여 사용되기도 한다. 그러나 신허혈 손상에 대한 이 두 약제의 효과는 보고에 따라 달라 신손상의 경감 또는 지연 등이 보고되었다. MMF는 생쥐 신장에서 허혈 손상에 의한 간질 내 염증을 감소시킨다는 보고가 있으나(12) 허혈성 흰쥐의 세뇨관 세포의 증식과 재생에는 보호효과가 없다고 하여 신세뇨관에 대한 직접적인 보호효과는 없다고 하였다.(6) RAP는 수지상 세포의 성숙을 억제하며 hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )의 경로를 차단하여 허혈 시 염증반응을 경감시킨다고 보고되었다.(13) 또한 최근 대장암 세포에서 RAP에 의해 TLR4의 mRNA 발현이 감소되고 TLR4의 하위 신호전달 경로에 있는 NF- $\kappa$ B의

활성을 억제함으로써 IL-6와 PGE2의 발현을 감소시킨다고 보고되었다.(14) 반면 RAP가 허혈 후 신기능의 회복을 지연시키고 세뇨관 세포의 자멸사를 증가시킨다는 상반된 보고도 있다.(15) 또한 RAP가 Akt경로를 차단함으로써 CsA 신독성을 증가시킨다는 보고가 있어(16) 허혈시 RAP의 세뇨관 보호효과도 불분명하다. 본 연구에서 MPA와 RAP는 저산소 하에서 증가한 TLR4의 mRNA를 농도의존적으로 유의있게 감소시켰다. 그러나 저산소 하에서 증가된 TLR4의 단백질은 RAP에 의해서만 유의성있게 감소하였다. MPA가 TLR4 mRNA와 단백질 표현간에 차이를 보인 점에 대해서는 전사 후 조절인자의 변화와 관련 있을 것으로 생각된다. 산소 결핍에 의해 증가된 TLR4단백이 MPA처리한 후에도 줄지 않는 결과로 미루어 MPA 자체는 세뇨관 상피에는 직접적인 보호 효과가 없다는 기존의 보고를 뒷받침한다.(12) 반면 허혈 손상 시 RAP은 세뇨관 상피세포 내 TLR4 표현을 억제시킴으로써 세뇨관 내 염증성 사이토카인을 줄이고, 이로 인한 세뇨관 손상을 줄이는 효과를 나타낼 수도 있을 것이라 생각된다. 이는 TLR4 기능이 없는 allele (TLR4 loss-of-function allele)를 가진 신장에서는 정상에 비해 TNF- $\alpha$ 와 MCP-1의 함유량이 적고, heme oxygenase 1의 양이 많을 뿐 아니라, 이식신이 즉각적으로 기능하는 예가 많다는 보고가(11) 뒷받침하고 있다. 그러나 신허혈과 관련된 보고된 RAP와 MMF의 투여 실험은 세뇨관 보호 효과가 염증세포 침윤 감소와 동반되어 있어 생체에서는 어느 것이 주된 역할인지 알기 어려운 점이 있다. 본 연구는 세뇨관세포에서 TLR발현만을 보고자 한 예비연구이므로 동물실험을 시행하지 않아 생체에서의 염증반응과의 상관성을 알 수 없었으며, 이로 인한 해석에 여러 제한점이 있다. RAP에 의한 세뇨관 상피세포의 보호 또는 손상효과에 대해서는 추후 RAP에 의한 세포자멸사, TLR4관련 하위 신호전달 경로, 그리고 관련 사이토카인의 변화에 대한 연구가 이루어져야 결론을 내릴 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구의 결과는 신세뇨관 상피세포주에서 저산소 하에서 증가된 TLR4의 mRNA와 단백질 발현이 RAP에 의해 유의성 있게 감소한다는 것으로, 신장의 허혈성 손상 시 RAP가 TLR4 매개 면역반응에 직접 또는 간접적인 기전을 통하여 작용할 수 있음을 시사하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2007년 대한이식학회 연구비로 수행되었음.

## REFERENCES

- 1) Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007;117:2847-59.
- 2) Land W. Postischemic reperfusion injury to allografts-a case for 'innate immunity'? *Eur Surg Res* 2002;34:160-9.
- 3) Kim BS, Lim SW, Li C, Kim JS, Sun BK, Ahn KO, et al. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation* 2005;79:1370-7.
- 4) Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* 2005;115:2894-903.
- 5) Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989;321:1725-38.
- 6) Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Verhulst A, Kockx M, Verpooten GA, et al. Effect of immunosuppression on damage, leukocyte infiltration, and regeneration after severe warm ischemia/reperfusion renal injury. *Kidney Int* 2003;64:864-73.
- 7) Lim SW, Li C, Ahn KO, Kim J, Moon IS, Ahn C, et al. Cyclosporine-induced renal injury induces toll-like receptor and maturation of dendritic cells. *Transplantation* 2005;80:691-9.
- 8) Braudeau C, Ashton-Chess J, Giral M, Dugast E, Louis S, Pallier A, et al. Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2008;86:130-6.
- 9) Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005;67:2454-61.
- 10) Palmer SM, Burch LH, Mir S, Smith SR, Kuo PC, Herczyk WF, et al. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. *Clin Transplant* 2006;20:30-6.
- 11) Kruger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3390-5.
- 12) Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, Goto T, Yonemura K, Hishida A. Mycophenolate mofetil inhibits regenerative repair in uranyl acetate-induced acute renal failure by reduced interstitial cellular response. *Am J Pathol* 2002;161:217-27.
- 13) Rama I, Bruene B, Torras J, Koehl R, Cruzado JM, Bestard O, et al. Hypoxia stimulus: An adaptive immune

- response during dendritic cell maturation. *Kidney Int* 2008;816-25.
- 14) Sun Q, Liu Q, Zheng Y, Cao X. Rapamycin suppresses TLR4-triggered IL-6 and PGE2 production of colon cancer cells by inhibiting TLR4 expression and NF-kappaB activation. *Mol Immunol* 2008;2929-36.
- 15) Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, Rennke H, Abernathy VE, Koh JS, et al. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F693-706.
- 16) Cheng CH, Chang HR, Chiang CW, Shu KH, Chou MC. Possible mechanism by which rapamycin increases cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 2008;40: 2373-5.
-